

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANA MICHALUZ DA SILVA

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS CONTRA *Botrytis* sp.

CURITIBA

2014

VIVIANA MICHALUZ DA SILVA

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS CONTRA *Botrytis* sp.

Monografia apresentada à disciplina BIO028 - Estágio Supervisionado em Biologia, do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patricia do Rocio Dalzoto.

CURITIBA

2014

A todos aqueles que acreditaram...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, como é impossível citar todas as pessoas importantes, agradeço a todos aqueles que fizeram parte de algum modo da minha vida em todos esses anos de graduação na UFPR. Professores, amigos, colegas, conhecidos e funcionários, obrigada por terem contribuído positivamente para a minha formação.

Agradeço à minha orientadora Profa. Patrícia Dalzoto, pelos seus ensinamentos e dedicação, por ter me estimulado a realizar esse estudo, pela sua compreensão, correções e incentivos, enfim, por ser a pessoa que é!

Agradeço à minha outra orientadora Profa. Ida Chapaval Pimentel, por me ajudar e ser tão compreensível nos momentos mais complicados e por sempre ver o lado positivo dos resultados “negativos”.

Agradeço ao pessoal do laboratório pela companhia e pelas risadas de sempre. E principalmente à Mariana Porsani, sempre disposta a ajudar.

Agradeço às minhas parceiras de graduação: Lu e Vane, que com certeza levarei para vida toda.

Agradeço aos meus amores: Meu pai Floriano, ao Teo, ao Nardo e a Catarina. Sem vocês nada disso teria sentido.

"QUANDO O HOMEM APRENDER A RESPEITAR ATÉ O MENOR SER DA CRIAÇÃO,
SEJA ANIMAL OU VEGETAL, NINGUÉM PRECISARÁ ENSINÁ-LO A AMAR SEU SEMELHANTE "

Albert Schweitzer (Nobel da Paz de 1952)

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* se destaca mundialmente pela sua importância econômica na produção florestal de madeira para os mais diversos fins. Na produção de mudas de *Eucalyptus* sp., uma das principais doenças de ocorrência em viveiros é o mofo-cinza, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*. O uso de produtos químicos no combate a doenças causadas por fungos fitopatogênicos, além de ter um alto custo, ocasiona problemas ao meio ambiente e ao homem, determinando graves danos à biota natural do solo, além de contribuir, por seleção, para o desenvolvimento da resistência microbiana. Uma das alternativas para o controle dessa doença é o controle biológico por actinobactérias ou utilizando seus metabólitos secundários. Diante disso, objetivou-se avaliar a atividade antagônica *in vitro*, de isolados de Actinobactérias ao fungo *Botrytis cinerea* isolado de *Eucalyptus* sp. O ensaio foi realizado por meio do teste de inibição. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 3 repetições. O isolado AS G31 5A 43 (*Streptomyces bacillaris*) se mostrou eficiente no controle de *B. cinerea* após 14 dias de tratamento. Os isolados de AD 11B 76 (*Streptomyces cavourensis*), AS 3A 26 (*Streptomyces cavourensis*) e AS G34 3B 18 (*Streptomyces variabilis*) inibiram significativamente o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, sendo que o isolado AD G27 12B 83 (*Streptomyces parvus*), se mostrou estatisticamente menos eficiente na inibição de *B. cinerea*.

Palavras chave: *Eucalyptus* sp, *Botrytis cinerea*, Actinobactérias, controle biológico.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* stands worldwide for its economic importance in forestry timber production for different purposes. In seedlings of *Eucalyptus* sp., a major disease occurrence in nurseries is gray mold, caused by the fungus *Botrytis cinerea*. The use of chemicals to combat diseases caused by phytopathogenic fungi, besides its high cost, causes problems to the environment and to humans, causing serious damage to the natural soil biota and contribute by selection for the development of microbial resistance. One alternative to control this disease is the biological control by Actinobacteria or by using its secondary metabolites. Therefore, we aimed to evaluate the *in vitro* antagonistic activity of actinobacteria against *Botrytis cinerea* isolated from *Eucalyptus* sp. The experiment was performed by inhibition tests. Experimental design was completely randomized with 6 treatments and 3 replicates. Isolate G31 5A AS 43 (*Streptomyces bacillaris*) was proved as effective for controlling *B. cinerea* after 14 days of treatment. Isolates 76 AD 11B (*Streptomyces cavourensis*), 3A AS 26 (*Streptomyces cavourensis*) and AS G34 3B 18 (*Streptomyces variabilis*) showed significant effect in inhibiting the mycelial growth in *Botrytis cinerea* and isolate G27 12B AD 83 (*Streptomyces parvus*), was statistically less efficient in inhibition of *B. cinerea*.

Keywords: *Eucalyptus* sp, *Botrytis cinerea*, Actinobacteria, biological control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 DOENÇAS EM <i>Eucalyptus</i> sp. EM VIVEIRO.....	10
1.2 O MOFO CINZENTO (<i>Botrytis cinerea</i>).....	11
1.3 O MOFO CINZENTO EM <i>Eucalyptus</i> sp.	13
1.4 CONTROLE BIOLÓGICO	15
1.5 ACTINOBACTÉRIAS.....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	18
2.2.1 Meio Czapeck Dox	18
2.2.2 Meio Sabouraud	19
2.3 MICROCULTIVO (KERN; BLEVINS, 1999)	19
2.4 MÉTODO DE INOCULAÇÃO (ADAPTADO DE BEUX, 2004)	20
2.5 TESTE DE INIBIÇÃO <i>in vitro</i> (ADAPTADO DE BEUX, 2008).....	20
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
3.1 MICROCULTIVO.....	22
3.2 TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>Botrytis cinerea</i> POR ACTINOBACTÉRIAS	23
4 CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICES.....	37

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto pertence à família das Mirtáceas, nativa da Oceania, principalmente nos países: Austrália, Timor, Indonésia, Filipinas e Nova Guiné, considerada umas das árvores mais plantadas do mundo (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2001). Existem mais de 600 espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* (L'Herit), e entre as principais espécies plantadas para fins comerciais, estão o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus viminalis*, *Eucalyptus deglupta*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus exserta*, *Eucalyptus paniculata* e *Eucalyptus robusta*. (CNA, 2011). O cultivo do eucalipto fora da Austrália iniciou-se há mais de 200 anos aproximadamente, e atualmente tem sido amplamente utilizado em vários países, em razão da grande diversidade de espécies e de usos, elevada taxa de crescimento, capacidade de regenerar-se por brotação a partir da cepa e ser manejado em várias rotações. A sua adaptabilidade em várias regiões bioclimáticas e geração de matéria-prima, atende a vários setores da cadeia produtiva da madeira (SCHULTZ, 2012).

A demanda por madeira e a competição de mercados estimulam a busca de alternativas para o aumento da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* sp. (CUNHA *et al*, 2006). Utilizado para fins de produção de papel e celulose, energia, madeira para serraria, tecido sintético, óleo essencial usado em produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e remédios (BERTOLA, 2004).

O Brasil se destaca no cenário mundial por possuir um excelente desempenho no setor florestal, tornando incontestável a importância econômica e socioambiental do setor de florestas plantadas. Entre 2000 e 2012, a rentabilidade média de ativos florestais brasileiros, medida pelo IRT-Pöyry (Índice de Rentabilidade Timberland), foi de 7,3% ao ano, um indicador superior à inflação do período e, também, superior ao retorno de outros investimentos de baixo risco, como por exemplo, a poupança (5,5% ao ano). Segundo a IBA (Indústria Brasileira de Árvores), em 2013, a receita bruta totalizou R\$ 60 bilhões, o que representa 6% do Produto Interno Bruto (PIB) Industrial. Em 2012, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* no Brasil totalizou 5.102.030 ha. Sendo que os estados de

Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Paraná detinham 83,6% dos plantios do gênero *Eucalyptus* (ABRAF, 2013). O Brasil é um dos líderes no ranking de exportadores do mercado internacional de produtos florestais, conquistando posição e ganhando competitividade de países tradicionais no ramo da celulose, como Finlândia e Suécia (VALVERDE *et al.*, 2004). Apesar do rápido crescimento e da produtividade de várias espécies de eucaliptos, aliviando, sem dúvida, a pressão por madeira de áreas nativas, existem custos ecológicos que devem ser considerados. Algumas espécies de eucaliptos são vulneráveis ao surgimento rápido de pragas. O eucalipto é atingido por vários patógenos, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Geralmente, os problemas são observados nas plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano (EMBRAPA, 2001).

1.1 DOENÇAS EM *Eucalyptus* sp. EM VIVEIROS

Doenças em eucalipto são de uma forma geral causas de danos e prejuízos para produtores e grandes empresas do ramo florestal (SCHULTZ, 2012). As espécies de eucalipto comercialmente cultivadas estão sujeitas a uma série de doenças fúngicas. Em viveiros, em função da umidade, juvenilidade e proximidade das mudas, existem condições favoráveis ao desenvolvimento de várias doenças, como tombamento de mudas, mofo-cinza, oídio, podridão de estacas, ferrugem e manchas foliares (GRIGOLETTI *et al.*, 2001).

Segundo Aparecido *et al.* (2008), na fase de produção de mudas em viveiros, existem várias doenças que podem comprometer o desenvolvimento das mudas. Dentre as doenças mais usuais, destaca-se o tombamento de mudas, que provoca a morte das plântulas na fase de germinação e de plântulas, causados pelos patógenos, *Cylindrocladium candelabrum* Viégas, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn. O sintoma típico da doença se caracteriza pela ocorrência de uma lesão na região do colo da plântula, a qual pode atingir tamanhos variáveis no caulículo. Apresenta, inicialmente, um aspecto encharcado, causando uma depressão na área e depois adquirindo coloração escura, resultante da necrose dos tecidos. A destruição dos tecidos acaba provocando o tombamento da plântula e a sua morte (APARECIDO *et al.*, 2008).

O oídio é causado pelo patógeno *Oidium* sp., tem como sintoma típico a ocorrência de uma lesão na região do colo da plântula, a qual pode atingir tamanhos variáveis no caulículo. O fungo incide em folhas e brotos jovens, causando encarquilhamento foliar e superbrotamento das plantas (FERREIRA, 1997, *apud* SILVA *et al.*, 2001). Apresenta, inicialmente, um aspecto encharcado, causando uma depressão na área e depois adquirindo coloração escura, resultante da necrose dos tecidos. A destruição dos tecidos acaba provocando o tombamento da plântula e a sua morte (APARECIDO *et al.*, 2008).

A podridão de raiz, causada pelos fungos *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Fusarium* sp. tem sido verificada em viveiros com sistema de tubetes. O uso de substrato de má drenagem, criando condições de alta umidade e aeração deficitária, juntamente com a presença de inóculo (vindo no substrato ou trazido pela água de irrigação), criam condições favoráveis à infecção por fungos fitopatogênicos. A podridão de estacas é causada pelos patógenos *Cylindrocladium candelabrum* Viégas, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia solani*. Os sintomas são bem característicos, tratando-se de uma lesão escura que progride da base para o ápice da estaca. A podridão pode estar localizada na região da interface estaca/substrato ou em porções superiores da estaca. A lesão avança sobre os tecidos da estaca, escurecendo-a por completo, provocando a morte das gemas e impedindo o seu enraizamento (APARECIDO *et al.*, 2008).

O mofo-cinzento, causado pelo agente *B. cinerea* é uma doença usualmente verificada no Sul e Sudeste do Brasil. Os ataques mais severos ocorrem em canteiros com alta densidade de mudas e sob condições de alta umidade e temperaturas amenas (GRIGOLETTI *et al.*, 2001).

1.2 O MOFO-CINZENTO (*Botrytis cinerea*)

Os fungos de gênero *Botrytis* são pleomórficos, caracterizados por apresentar fase telomórfica, sendo denominado como *Botryotinia fuckeliana* e anamórfica, como *Botrytis cinerea* (ACERO, 2006). Como regra geral, a taxonomia recomenda o uso do nome correspondente ao estado sexual como nome científico, nesse caso o agente etiológico do mofo-cinzento deveria ser *Botryotinia fuckeliana*. No entanto, em 1992, no “X International Botrytis Symposium”, realizado na Grécia, devido à

designação *B. cinerea* ser amplamente reconhecida pelos cientistas e por raras vezes ser possível encontrar o estágio telemorfo na natureza, por concordância, os cientistas decidiram manter o uso do nome do estágio anamorfo, *Botrytis cinerea* (VALEJJO *et al.*, 2002).

Botrytis cinerea, portanto é um ascomiceto e sua posição taxonômica de acordo com o Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries (2014) é:

Reino Fungi

Filo Ascomycota

Subfilo Pezizomycotina

Classe Leotiomycetes

Ordem Helotiales

Família Sclerotiniaceae

Gênero Botryotinia

Espécie *Botrytis cinerea*

Os fitopatógenos do gênero *Botrytis* são os causadores da doença conhecida como “mofo-cinzeno”. Provavelmente é a doença mais comum e mais amplamente distribuída em culturas agrícolas, ornamentais e frutíferas pelo mundo, além de ser a doença mais importante em cultivos protegidos por estufas (AGRIOS, 1988). É um patógeno facultativo que vive saprofiticamente no solo e sobrevive na forma de esclerócios ou micélio dormente. Sua disseminação dá-se principalmente pelo transporte dos conídios pelo vento e por insetos (FURTADO *et al.*, 2000; KRUGNER; AUER, 2005). Epidemias de mofo-cinzeno são esporádicas. No sudoeste da China, em 1992, ela causou a morte de cerca de um milhão de propágulos, incluindo plântulas, estacas e explantes, em viveiros de eucalipto (BROWN; FERREIRA, 2000).

Botrytis sp. é um patógeno necrotrófico que pode exibir quiescência durante seu desenvolvimento, o qual pode ser dividido em duas fases, uma não agressiva e invisível a olho nu e outra agressiva e de rápida expansão. Este fungo tem crescimento e esporulação abundantes em temperaturas moderadas (15°C até

25°C), sendo ativo desde 0°C, tornando-o um patógeno importante durante o armazenamento do produto e um desafio para o manejo da doença. A esporulação abundante e a dispersão dos conídios pelo ar são uma constante ameaça para as culturas suscetíveis (ELAD; STEWART, 2007).

Seu crescimento é rápido, ocorre nos mais diversos tipos de climas e solos, sendo que seu crescimento ótimo ocorre em temperaturas moderadas, e também possui a flexibilidade de crescer em diferentes fontes de nutrientes (MOORMAN, 2014). *Botrytis cinerea* pode infectar mais de 235 espécies diferentes de plantas, dentre elas, uma enorme variedade de plantas ornamentais, culturas de frutas e legumes e vegetais. As estruturas danificadas são as mais variadas, e dependem do hospedeiro e do órgão afetado, como folhas, pecíolos, caule, botões florais e pétalas. Apesar dos sintomas do mofo-cinzento variar em função do hospedeiro e do órgão afetado, esses são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de um crescimento cottonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas. A doença é favorecida por temperaturas amenas e alta umidade do ar, que é o fator mais importante. Chuvas frequentes induzem ataques severos da doença (EMBRAPA, 2005). O mofo-cinzento causa prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos, tornando o controle difícil em condições onde se observa falta de rigor técnico na condução do cultivo e em condições meteorológicas favoráveis a doença (TOFOLI *et al.*, 2011).

1.3 O MOFO-CINZENTO EM *Eucalyptus* sp.

O mofo-cinzento é uma das principais doenças em viveiros florestais e casas de vegetação de eucalipto na região Sul do Brasil (EMBRAPA, 2005), causador de tombamento de plântulas e mudas (ALFENAS *et al.*, 2009), mas também pode atacar árvores jovens (FURTADO *et al.*, 2009). A doença tem sido mais frequente em viveiros localizados nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, principalmente no inverno, ocasionando perdas que podem chegar de 8 a 17% (SANFENTES *et al.*, 1997). Os esporos produzidos sobre as lesões constituem importante fonte de inóculo em epidemias (ARAÚJO, 1995), os quais são facilmente disseminados pelo vento e pela água de irrigação (FERREIRA; MILANI, 2002).

O tombamento de mudas é uma doença de importância limitada a viveiros de eucalipto e outras essências florestais. Em sementeiras para produção de mudas, que serão repicadas para recipientes, a ocorrência de ataques severos é maior que em mudas formadas pela semeadura direta em recipientes. Como a doença, invariavelmente resulta na morte das mudas, os prejuízos se traduzem na redução do 'stand' de mudas plantáveis, podendo causar atrasos no programa de plantio pela falta de mudas e exigir mobilização de maior área de canteiros para atender às necessidades de plantio (SILVA; COELHO, 2003 *apud* FERREIRA, 1989).

Os ataques mais severos ocorrem em canteiros com alta densidade de mudas e sob condições de alta umidade do ar e temperaturas amenas. A doença afeta tecidos jovens da parte aérea das mudas, causando a morte do ápice ou até mesmo da muda toda, especialmente de mudas jovens. Os sintomas iniciam-se por um enrolamento das folhas seguido de seca e queda das mesmas (Fig. 1). Comumente, um crescimento acinzentado formado por micélio, conidióforos e massa de conídios do fungo aparece cobrindo as partes afetadas da planta (AUER; KRUGNER, 2005).



Figura 1: Morte de muda de *Eucalyptus "urograndis"*, causado pelo mofo-cinzento.
Fonte: AUER *et al.*, 2005

As perdas na produção de mudas de *Eucalyptus* sp. causadas por patógenos giram em torno de 1% ao mês, quando não ocorrem surtos epidêmicos que podem levar a perdas de até 100% do material propagativo (ALFENAS *et al.*, 2009). Em 1992, no sul da China na província de Guangxi, *B. cinerea* causou a perda de aproximadamente um milhão de mudas de eucaliptos em viveiro. No inverno de 1990 e 1991, a doença causou severas perdas na província de Yunnan (KEANE *et al.*, 2000 *apud* ZHOU DEQUN; SUTHERLAND, 1991).

1.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico foi definido por DeBach (1968) como “a ação de parasitóides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”. Basicamente, o controle biológico pode ser definido como a regulação de uma espécie dentro de certos limites, por um período de tempo, por qualquer combinação de fatores naturais bióticos ou abióticos (DIEHL *et al.*, 2012).

O controle de *Botrytis* não é fácil por várias razões, dentre elas: ser capaz de infectar culturas vegetais em qualquer estágio de desenvolvimento, incluindo a pós-colheita; tem capacidade de infectar qualquer órgão da planta; pode crescer em temperaturas muito baixas e; é geneticamente e morfológicamente heterogêneo (PERRYMAN, 2002). O controle é feito através do manejo, como redução da densidade das mudas no viveiro, dosagem correta de adubos nitrogenados e a retirada das folhas infectadas das plantas e as caídas no solo. Além do manejo, o controle químico pode ser feito com pulverização de thiram, manzate, captan, iprodione ou vinclozolin (CIFLORESTAS – Centro de Inteligência de Florestas, 2014).

O uso de produtos químicos no combate a doenças causadas por fungos fitopatógenos como *Botrytis*, além de ter um alto custo, ocasiona problemas ao meio ambiente e ao homem, determinando graves danos à biota natural do solo, atingindo e contaminando águas superficiais e subterrâneas, além de contribuir para o desenvolvimento da resistência microbiana. Segundo Guerra (1997), a contaminação das águas superficiais por fertilizantes e agrotóxicos que são usados para gerenciar as plantações de eucaliptos é de em média de 200 kg/hectare.

O uso exacerbado de agrotóxicos além de prejudicar o ambiente, favorece o aparecimento de linhagens de patógenos resistentes aos elementos ativos destes produtos (CAPIEAU *et al.*, 2004). No Brasil, foi observado por muitos pesquisadores, a resistência deste patógeno em estudos feitos com morango, eucalipto, rosa, berinjela, crisântemo, batata, violeta, begônia, pimenta, maçã e uva (PINOTTI, 2013 apud GHINI; KIMATI, 2002). Silva e Coelho (2003), constataram a resistência de *B. cinerea* aos fungicidas sistêmicos benomil, procimidone e thiabendazole.

Esses e outros motivos, como a pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos, têm exigido dos pesquisadores e da indústria maior empenho em

programas de controle biológico. Práticas de manejo que favoreçam o desenvolvimento de antagonistas nativos, bem como a introdução de microrganismos selecionados, são estratégias que podem ser utilizadas no controle biológico de fitopatógenos (CHOUDHURY, 2001).

Neste contexto, o manejo de doenças de plantas por meio do controle biológico é uma alternativa agro-ecológica, contribuindo para a substituição do uso de fungicidas químicos tradicionalmente utilizados (GUIMARÃES, 2007). O controle biológico, por meio do uso de microrganismos antagonistas, vem sendo bastante investigado visando melhorar a eficiência de controle do mofo-cinza, causado por *B. cinerea* em frutas, vegetais e plantas ornamentais (YOHALEM, 2004; SUTTON *et al.*, 1997), além de ser uma forma de controle que evita os riscos ocupacionais associados à exposição dos trabalhadores aos fungicidas e de resíduos destes nos produtos colhidos e no ambiente (SUTTON *et al.*, 1997). Entre os microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se o grupo das actinobactérias, reconhecidos como os principais produtores de inúmeros metabólitos secundários, principalmente os antibióticos, devido ao seu amplo espectro de ação em relação à célula alvo, com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (ZAGO *et al.*, 2000; MIYAUCHI, 2012; ROMEIRO, 2007).

1.5 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ecossistemas e podem colonizar diversos substratos (ARAÚJO, 1998). São uma classe heterogênea de bactérias gram-positivas, superficialmente sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, pois formam hifas multinucleadas que se ramificam formando um micélio. Também são capazes de produzir cadeias de esporos semelhantes aos conídios. Possuem um alto teor de G+C no seu DNA, chegando até 70% em algumas espécies (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ *et al.*, 2002). De distribuição mundial, são encontradas nos mais variados ecossistemas, principalmente no solo. Vivem em sua maioria como saprófitos, exercendo um importante papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outras

estão em relação mutualística ou parasita com plantas (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Seus metabólitos secundários são de interesse biotecnológico, dentre eles: amilases, celulasas, lipases, pectinases, quitinases, xilanases, peroxidases, vitaminas do complexo B, fitormônios, agentes antitumorais e agentes imunodepressivos (MIYAUCHI, 2012). Ainda, como produto do metabolismo secundário destes procariotos, ocorre a produção de antibióticos que podem atuar no controle de fitopatógenos (ZAGO *et al.*, 2000). A produção dessas substâncias pelas actinobactérias as tornam fortes candidatas a agentes no biocontrole de fitopatógenos em plantas.

Estudos promissores realizados por El-Tarabily (2009), demonstraram que actinobactérias endofíticas foram capazes de colonizar raízes de pepino por oito semanas e suprimir a atividade fitopatogênica de *Pythium aphanidermatum*. Legitimando como actinobactérias, podem apresentar um eficiente controle sobre fitopatógenos, podendo até substituir fungicidas químicos. Também em estudos realizados por Miyauchi (2012), actinobactérias foram eficazes no biocontrole da atividade de do fungo *Fusarium* sp., reduzindo a mortalidade de plântulas de *Pinus* spp. em cerca de 25%. Porsani *et al.* (2013), isolaram 116 actinobactérias do gênero *Nocardia* e *Streptomyces* da região entre-marés da Ilha do Mel, PR e destas 79 apresentaram a capacidade antimicrobiana contra as cepas patogênicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Com base nesses pressupostos, neste trabalho, pretende-se avaliar *in vitro* a atividade inibitória de actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, sobre o fitopatógeno *Botrytis cinerea* isolado de mudas de *Eucalyptus* sp., no intuito de atestar a capacidade de biocontrole de actinobactérias frente ao agente causal do mofo-cinzento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O isolado do fitopatógeno *B. cinerea*, foi cedido gentilmente pelo Dr. Celso Garcia Auer, do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Os isolados de actinobactérias, obtidos por Porsani *et al.*, (2013), da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, são provenientes do banco biológico Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UFPR (LabMicro). Dos 116 isolados pertencentes ao banco biológico cinco isolados foram identificados e sequenciados por Porsani *et al.*, (2013) (QUADRO 1).

Quadro 1. Actinobactérias isoladas da região entre marés da Ilha do Mel, PR, a serem utilizadas no presente trabalho.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	ACESSO GENBANK
AD G27 12B 83	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces parvus</i>	JX997139
AS G31 5A 43	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces bacilaris</i>	JX997140
AD 11B 76	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>	JX997147
AS 3A 26	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces cavourensis</i>	JX997143
AS G34 3B 18	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces variabilis</i>	JN180216.1

2.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

2.2.1 Meio Czapeck Dox

Sacarose..... 30,0 g
 Nitrato de Sódio..... 3,0 g
 Fosfato Dipotássio..... 1,0 g
 Sulfato de Magnésio..... 0,5 g
 Cloreto de Potássio..... 0,5 g
 Sulfato Ferroso..... 0,01 g
 Água destilada..... 1.000 mL
 Ágar.....15,0 g

pH a 25°C $7,3 \pm 0,2$

O Meio Czapeck Dox será utilizado para a inoculação das actinobactérias.

2.2.2 Meio Sabouraud

Glicose..... 40,0 g
 Peptona..... 10,0 g
 Ágar.....15,0 g
 Água destilada..... 1.000 mL
 pH a 25°C $5,6 \pm 0,2$

Corrigiu-se o pH dos meios adicionando-se NaOH 10% e/ou HCl 10% conforme a necessidade. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C, 1 atm, por 20 minutos.

2.3 MICROCULTIVO (KERN; BLEVINS, 1999)

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura de Sabouraud (ITEM 2.2.2) foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o *B. cinerea* em todos os lados do cubo, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 25°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de água, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 400X e fotografadas. A sua classificação, foi realizada através da utilização de literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1972; LARONE, 1993).

2.4 MÉTODO DE INOCULAÇÃO (ADAPTADO DE BEUX, 2004)

A técnica de inoculação utilizada foi a do espalhamento em superfície com alça de Drigalski, que consiste em utilizar um bastão de vidro em formato de T para espalhar de maneira igual a solução de esporos sobre o meio de cultura.

2.5 TESTE DE INIBIÇÃO *in vitro* (ADAPTADO DE BEUX, 2008)

Para avaliar a inibição de *B. cinerea* pelas actinobactérias, foi realizado um teste de inibição, adaptado de Beux (2004). Uma suspensão salina contendo 3×10^8 células de actinobactéria, padronizadas de acordo com a escala McFarland, cultivadas em meio SDA durante 5 dias a 27°C, foram espalhadas em uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo o mesmo meio SDA, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, foi retirado um bloco de 6mm de diâmetro do centro da placa e inserido outro bloco contendo uma cultura de *Botrytis cinerea* crescida por 5 dias em seu lugar, após esse procedimento, foi incubado por 14 dias a 25°C.

O controle foi feito utilizando apenas *Botrytis cinerea* em um bloco de 6 mm da cultura no centro da placa. O diâmetro do crescimento foi medido com o auxílio de uma régua após 7 e 14 dias incubados a 25°C.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos seguiram um delineamento inteiramente casualizado, com os dados transformados ($\log x+1$), para normalização das diferenças entre os mesmos. Em seguida foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a 1% de probabilidade e um teste de médias, quando necessário (Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade).

Todas as análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT 7.7 (SILVA, 2009).

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno mediu-se o diâmetro das colônias, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial e calculada de acordo com Edginton *et al.*, (1971), pela formula:

$$(PI\%) = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \cdot 100, \text{ onde:}$$

PI% = porcentagem de inibição;

D_c = diâmetro médio da colônia de controle de *B. cinerea*;

D_t = diâmetro médio da colônia de *B. cinerea* crescida na placa contendo Actinobactéria.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MICROCULTIVO

O objetivo do teste de microcultivo foi observar microscopicamente as características do isolado conforme semelhança, já que nesta situação as estruturas permanecem íntegras. O isolado B1-3, foi submetido à técnica, possibilitando a verificação das características do gênero *Botrytis*. Na análise macroscópica foi possível a visualização de escleródios negros, duros e irregulares na borda da placa (Fig.2).

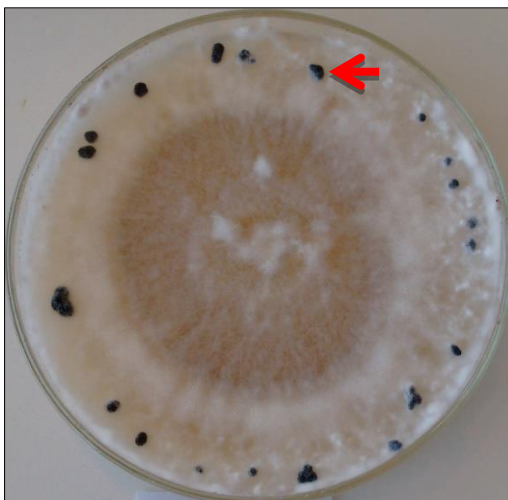


Figura 2: Macromorfologia da colônia de *B. cinerea* cultivado em meio Sabouraud à 25° C, por 14 dias. NOTA: É possível a visualização de escleródios.

Nas observações em microscópio, o fungo apresentou micélio com hifas ramificadas, septadas, cor marrom acinzentado ou marrom. Conidióforos longos, eretos, ramificados no ápice, com conídios terminais, formando agregados no ápice do conidióforo. Conídios elipsoides a obovóides, acinzentados (Fig. 3). De acordo com a micromorfologia observada pode-se inferir que o isolado B1-3 é *Botrytis cinerea* (LARONE,1993).

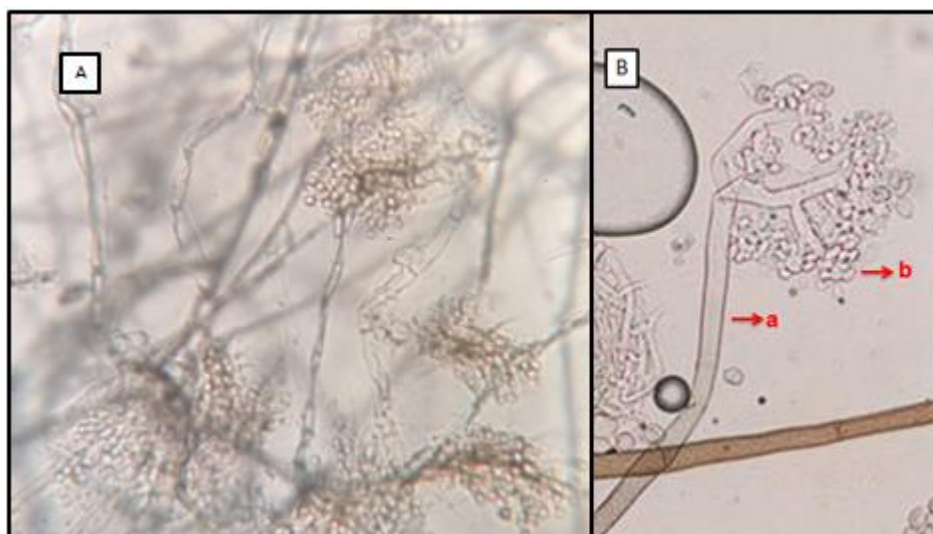


Figura 3. Micromorfologia de *Botrytis cinerea*. **A)** Estrutura de reprodução em aumento 100x **B)** a) Conidióforo em aumento de 400x e b) conídios.

3.2 TESTE DE INIBIÇÃO DE *Botrytis cinerea* POR ACTINOBACTÉRIAS

Analizando individualmente o desempenho de cada actinobactéria frente ao *B. cinerea*, foi possível observar os seguintes resultados de acordo com a porcentagem de inibição formulada por Edginton *et al.*,(1971),:

O isolado AS G31 5A 43 (*S. bacilaris*) apresentou uma porcentagem de inibição de 61% em 7 dias e de 58 % em 14 dias de experimento (Fig.4).

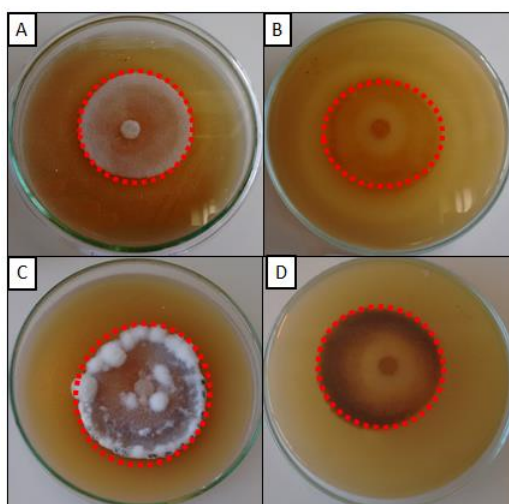


Figura 4. Teste de inibição da Actinobactéria AS G31 5A 43 (*S.bacilaris*) contra *B.cinerea*. Após 7 dias de incubação (a) verso e (b) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (c) verso e (d) reverso da placa. NOTA: O crescimento do fungo está delimitado em vermelho.

O isolado AS G34 3B 18 (*S. variabilis*) apresentou uma porcentagem de inibição de 85% em 7 dias e de 82 % em 14 dias de experimento (Fig. 5).

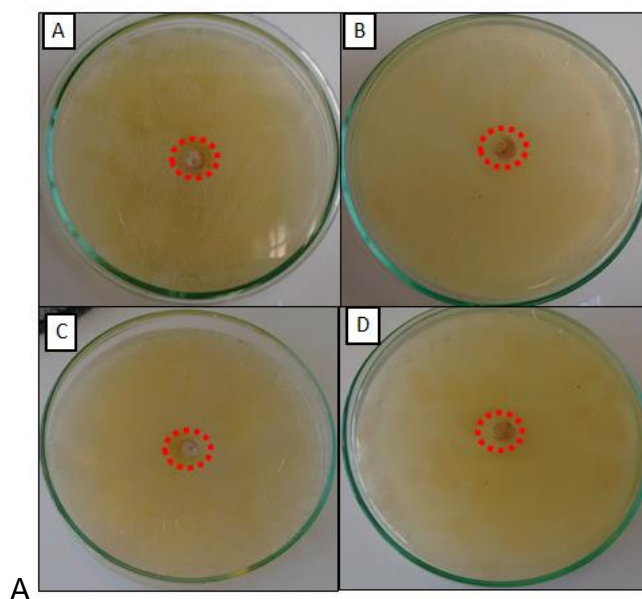


Figura 5. Teste de inibição da Actinobactéria AS G34 3B 18 (*S. bacilaris*) contra *B.cinerea*. Após 7 dias de incubação (a) verso e (b) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (c) verso e (d) reverso da placa. NOTA: O crescimento do fungo está delimitado em vermelho.

O isolado AS 3A 26 (*S. cavourensis*) apresentou uma porcentagem de inibição de 83% em 7 dias e de 82% em 14 dias de experimento (Fig. 6).

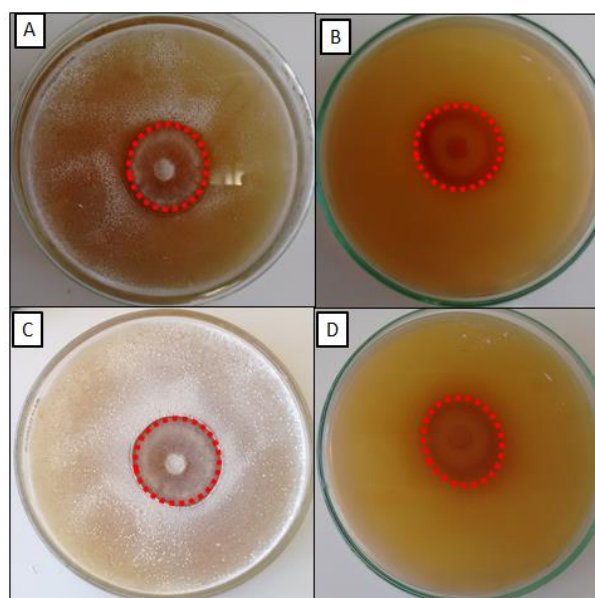


Figura 6. Teste de inibição da Actinobactéria AS 3A 26 (*S. cavourensis*) contra *B.cinerea*. Após 7 dias de incubação (a) verso e (b) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (c) verso e (d) reverso da placa. NOTA: O crescimento do fungo está delimitado em vermelho.

O isolado AD G27 12B 83 (*S. parvus*) apresentou uma porcentagem de inibição de 44% em 7 dias e de 0% em 14 dias de experimento (Fig. 7). Pode se

inferir que não houve inibição aos 7 dias de incubação, e sim houve o crescimento normal do patógeno até dominar toda extensão da placa.

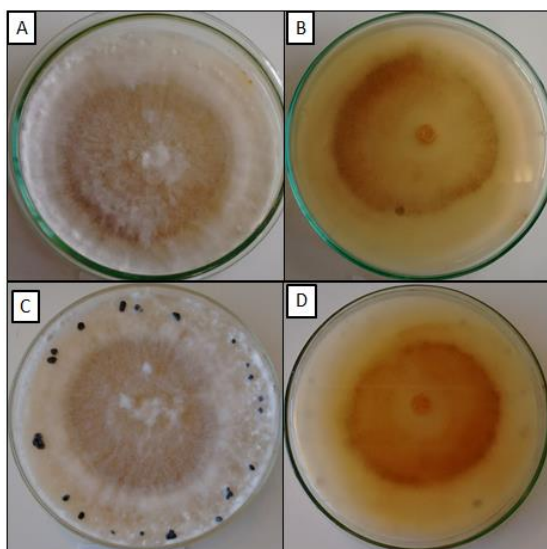


Figura 7. Teste de inibição da Actinobactéria AD G27 12B 83 (*S. parvus*) contra *B.cinerea*. Após 7 dias de incubação (a) verso e (b) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (c) verso e (d) reverso da placa.

O isolado AD 11B 76 (*S. cavourensis*) apresentou uma porcentagem de inibição de 90% em 7 dias e de 81% em 14 dias de experimento (Fig. 8).

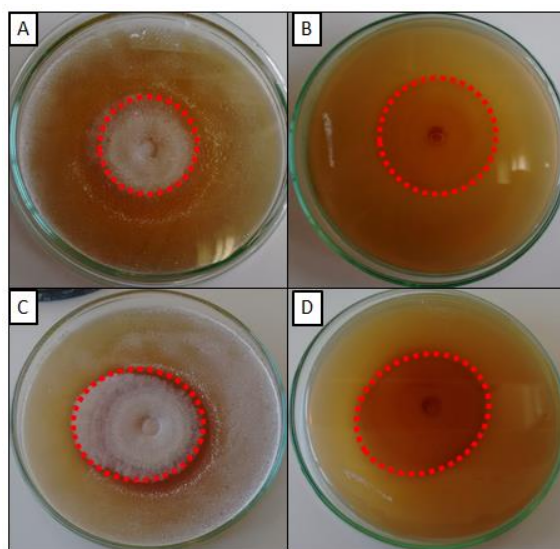


Figura 8. Teste de inibição da Actinobactéria AD 11B 76 (*Streptomyces cavourensis*) contra *B.cinerea*. Após 7 dias de incubação (a) verso e (b) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (c) verso e (d) reverso da placa. NOTA: O crescimento do fungo está delimitado em vermelho.

O controle no qual foi inserido somente um bloco de 0,6mm de uma colônia de *B. cinerea* crescida, apresentou um abundante crescimento. Com apenas 7 dias o micélio já havia tomado toda a placa (Fig. 9).

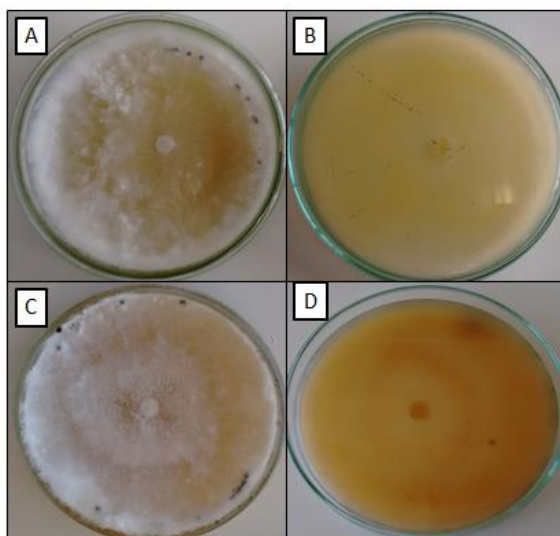


Figura 9. Teste controle, apenas crescimento micelial de *B. cinerea*. Em (a) e (c) é possível a visualização de escleródios.

Comparando todas as porcentagens de inibição obtidas através do método de formulado por Edginton *et al.*, (1971), conclui-se que os isolados de actinobactérias AS G3 5A 43, AD 11B 76 e AS G34 3B 18 foram os mais eficientes no antagonismo de *B. cinerea* (Fig.10).

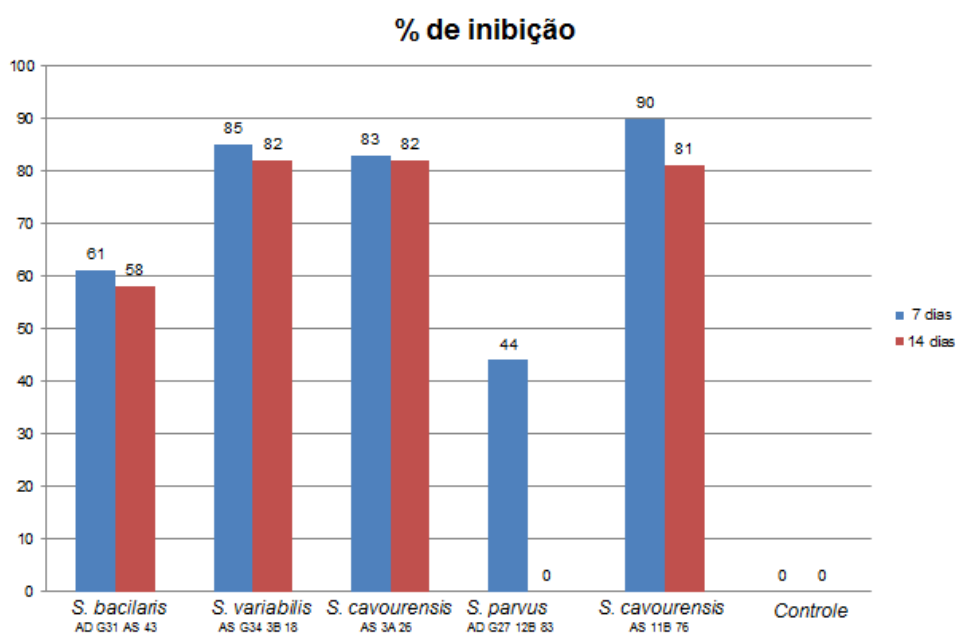


Figura 10. Porcentagem de inibição.

Os valores de F obtidos foram altamente significativos a 1% de probabilidade (Apêndices 1 e 2), evidenciando que há diferença estatística no crescimento fúngico de *B. cinerea* nos controles e nos tratamentos. *B. cinerea*, em contato com as

actinobactérias, apresentaram medidas de crescimento inferiores em relação ao controle, tanto com 7 dias como com 14 dias de crescimento. Com exceção da actinobactéria AD G27 12B 83 (*S. parvus*), que mostrou-se estatisticamente menos eficiente na inibição de *B. cinerea* com 7 e 14 dias de tratamento, as demais comportaram-se de forma semelhante, ou seja, são capazes de inibir *B. cinerea* (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de inibição. Isolados *S. cavourensis*, *S. bacillaris* e *S. variabilis* foram eficientes com 7 e 14 dias. Já *S. parvus*, foi menos eficiente com 7 e 14 dias de tratamento.

Isolado	Identificação	% de Inibição	
		7 dias	14 dias
AD G27 12B 83	<i>Streptomyces bacillaris</i>	61%	58%
AS G31 5A 43	<i>Streptomyces variabilis</i>	85%	82%
AD 11B 76	<i>Streptomyces cavourensis</i>	83%	82%
AS 3A 26	<i>Streptomyces parvus</i>	44%	0%
AS G34 3B 18	<i>Streptomyces cavourensis</i>	90%	81%
***	Controle	0%	0%

Foi possível observar que o crescimento do fitopatógeno *B. cinerea* foi inibido pelas actinobactérias *S. parvus*, *S. cavourensis*, *S. bacillaris* e *S. variabilis*.

De acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade realizado com as medições de 7 dias os isolados AD G27 12B 83 (*S. parvus*) e AS G31 5A 43 (*S. bacillaris*), apresentaram uma baixa eficiência no potencial antagônico, não diferindo estatisticamente do controle. Os demais isolados AD 11B 76 (*S. cavourensis*), AS 3A 26 (*S. cavourensis*) e AS G34 3B 18 (*S. variabilis*) se mostraram estatisticamente eficientes no potencial antagônico *B. cinera* com 7 dias de tratamento (Apêndice 1).

Já os resultados obtidos aos 14 dias de tratamento, os demais isolados AS G31 5A 43 (*S. bacillaris*), AD 11B 76 (*S. cavourensis*), AS 3A 26 (*S. cavourensis*) e AS G34 3B 18 (*S. variabilis*) se mostraram estatisticamente eficientes no potencial antagônico frente ao *B. cinera* com 14 dias de tratamento (Apêndice 2).

Pode-se inferir que as actinobactérias que apresentaram potencial inibição frente ao *B. cinerea* com 7 e 14 dias de tratamento foram: AD 11B 76 (*S. cavourensis*), AS 3A 26 (*S. cavourensis*) e AS G34 3B 18 (*S. variabilis*).

Os 5 isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* avaliados neste trabalho, previamente obtidos por Porsani *et al.* (2013) já haviam apresentado atividade inibitória contra organismos patogênicos. Os autores isolaram 116

actinobactérias da região entre marés da Ilha do Mel, Paraná, Brasil. Dentre estas, 68% apresentaram atividade contra organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2. Avaliação da atividade antimicrobiana de actinobactérias contra patógenos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) E *Candida albicans* (ATCC 10231).

Isolado	Identificação	Atividade antimicrobiana			
		E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans
AD G27 12B 83	<i>Streptomyces parvus</i>	+	-	-	+
AS G31 5A 43	<i>Streptomyces bacilaris</i>	+	++	-	+
AD 11B 76	<i>Streptomyces cavourensis</i>	++	+	+	-
AS 3A 26	<i>Streptomyces cavourensis</i>	+	-	-	+++
AS G34 3B 18	<i>Streptomyces variabilis</i>	++	-	-	+++

Nota: + indica um halo menor do que 15 mm de diâmetro, ++ indica um halo igual ou maior do que 15 mm de diâmetro e +++ indica um halo maior ou igual a 20 mm de diâmetro. – indica a ausência de atividade antimicrobiana.

FONTE: Adaptado de Porsani *et al.* (2013).

Estes resultados são corroborados por vários outros estudos que testaram a atividade inibitória de actinobactérias em relação ao *B. cinerea* e a outros microorganismos. Oliveira (2004) avaliou a atividade antagônica de actinobactérias frente a dois isolados *B.cinerea* isolados de videiras. Das 63 linhagens de actinobactérias testadas, 19 apresentaram atividade antifúngica. Loqman *et al.* (2009), também trabalharam com videiras, esses autores isolaram 142 actinobactérias da rizosfera de *Vitis vinifera* L. no Marrocos e as testaram contra cinco fitopatógenos, dentre eles o *B. cinerea*. Nove isolados foram capazes de inibir todos os patógenos, e também capazes de proteger mudas de videiras em testes *in vivo*. Seis destes isolados pertenciam ao gênero *Streptomyces* e três do gênero *Micromonospora*. Estes resultados indicaram o potencial de actinobactérias para o controle biológico de *Botrytis cinerea*.

Franco e Misk (2011) isolaram onze linhagens de actinobactéria de diferentes plantas, lentilha (*Lens esculentus*), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), ervilha (*Pisum sativum*), fava (*Vicia faba*) e trigo (*Triticum vulgare*) da cidade Paskerville, no Sul da Austrália. E todas as actinobactérias apresentaram atividade antimicrobiana frente ao fitopatógeno *B. cinerea*. Newhook (2008) testou a inoculação prévia no solo de

suspensões de actinobactérias, e obteve sucesso no controle de *B. cinerea* em alface.

De 60 linhagens de actinobactérias isoladas de plantas saudáveis de milho por Melo (2009), cultivadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo. 71% foram capazes de inibir o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos como *Pythium aphanidermatum* e *Fusarium moliforme*, 56% foram capazes de inibir bactérias gram positivas como *Bacillus megaterium* e *Staphylococcus aureus* e 49% foram capazes de inibir bactérias gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*.

Soares *et al.* (2009), encontraram atividade antifúngica em exemplares de *Streptomyces* sobre os fungos *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporum*, fitopatogênicos do tomateiro. Os resultados do trabalho mostraram que estas actinobactérias possuem potencial para o uso em controle biológico, pois foram capazes de inibir em até 94,1% o crescimento dos patógenos. Carrer *et al.* (2008), também avaliaram o potencial de actinobactérias frente a patógenos do tomateiro. Os autores utilizaram um isolado pertencente ao gênero *Nocardia*, esse antagonista foi hábil em reduzir a severidade de *A. solani*, *S. solani*, *C. cassicola*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *P. syringae* pv. *tomato*. Em condições de campo, quando a actinobactéria foi pulverizada semanalmente por atomização, a severidade das doenças foi reduzida em comparação com o controle.

Kumar *et al.* (2012) observaram atividade antimicrobiana de várias actinobactérias pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Saccharoployspora*, *Nocardiopsis* e *Planobiospora* contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os autores também testaram a produção enzimática destas actinobactérias, detectando enzimas como amilase, caseinase, celulase, xilanase, lipase e gelatinase. Os autores consideraram que estes resultados reforçam a importância da produção de enzimas de interesse biotecnológico e industrial.

4 CONCLUSÕES

- De acordo com a micromorfologia observada pôde-se concluir que o isolado B1-3 pertence a espécie *Botrytis cinerea*.
- As actinobactérias que apresentaram potencial inibição frente ao *Botrytis cinerea* com 7 e 14 dias de tratamento foram: AD 11B 76 (*Streptomyces cavourensis*), AS 3A 26 (*Streptomyces cavourensis*) e AS G34 3B 18 (*Streptomyces variabilis*).
- O isolado AS G31 5A 43 (*Streptomyces bacilaris*) apresentou uma baixa eficiência no potencial antagônico com 7 dias de tratamento, não diferindo estatisticamente do controle. Mas aos 14 dias de tratamento se mostrou eficiente no potencial antagônico frente ao *B.cinerea*.
- A actinobactéria AD G27 12B 83 (*Streptomyces parvus*), se mostrou estatisticamente menos eficiente na inibição de *B. cinerea* com 7 e 14 dias de tratamento.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 3. Ed. Academic Press, San Diego. 803p, 1988.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 Edição. Viçosa, MG. Editora UFV. 2009.

APARECIDO, C. C.; FURTADO, E. L.; FIGUEIREDO, M. B. **Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. Summa phytopathology**. Botucatu, v.34, n.1. Jan./Feb. 2008.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L, ed. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 351-367.

ARAÚJO, A.E. **Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores do ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa-de-vegetação**. (Dissertação de Mestrado). Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 1995.

AUER, C. G.; BIZI, R. M.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Metodologia para Inoculação Padronizada de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus dunnii*. **Comunicado técnico 134**. Embrapa. Colombo, PR. 2005.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. New York: MacMillan, 1972. 241p.

BERTOLA, A. **Eucalipto - 100 anos de Brasil: "Falem mal, mas continuem falando de mim!"**. Disponível em: <http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto_100%20anos%20de%20Brasil_Alexandre_Bertola.pdf> Acesso em: 13/05/2014.

BEUX, M. R. **Café – Estudo da biodiversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ochratoxina A**. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. *Diseases during propagation of eucalypts*. In: KEANE, P. J.; KILE, G. A.; PODGER, F. D.; BROWN, B. N. Eds. Diseases and pathogens of Eucalypts. **Collingwood: CSIRO Publish.**, p. 119-151. 2000.

CAPIEAU, K. Potencial de controle biológico de *Botrytis cinerea* em mudas de *Pinus sylvestris*. **Scandial Journal of Forest Research** , v.19, p.312-319, 2004.

CARRER, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioideus thermophilus*. **Tropical Plant Pathology**, vol. 33, 6, 457-460, 2008.

DEBACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Editora Continental, S.A., México. 927p. 1968

CIFLORESTAS – Centro de Inteligência de Florestas. Disponível: <<http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>> Acesso em: 23/06/2014.

CHOUDHURY, M. M. Uva de mesa – Pós-colheita. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 55p., 2001.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* sp. **Revista Árvore**. Vol.30. n. 6. Viçosa, Nov/Dec. 2006.

DIEHL, M.; FERLA, N. J.; JOHANN, L. Plantas associadas à videiras: uma estratégia para controle biológico no Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.4, p.579-586, out./dez., 2012

ELAD, Y. & STEWART, A. Microbial control of Botrytis spp. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. **Botrytis: biology, pathology and control**. 1.ed. Dordrecht: Springer, 2007. p. 223-41.

EI-TARABILY, K.A., NASSAR, A.H. *Plant growth promotion and biological control of Pythium aphanidermatum, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes*. **Journal of Applied Microbiology**, 107 (5). pp. 1765-1766 . 2009.

FRANCO, C.; MISK, A. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. **BioControl**, Volume 56, Issue 5, 2011

FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do Eucalipto no Brasil**. Botucatu: UNESP, 2009.

GUERRA, C. B., 1997, Environment and work in the Eucalyptus world: a case study from the Piracicaba River region, in Minas Gerais, Brazil. **Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos**, Salvador, pp. 17-24.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**. v .37, 1983.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; FIGUEIREDO, A. S.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**. V.30, n. 12. 2000.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. **Estratégia de manejo de doenças em viveiros florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, p.7. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 4). 2001.

GUIMARÃES, A. M.; DAL SOGLIO, F. Desenvolvimento participativo de controle biológico da mancha preta dos Citros na Região do Vale do Caí, RS, Brasil. **Rev Bras Agroecologia**, v. 2, n. 2, 2007.

KEANE, P. J.; KILE, G. A.; PODGER, F. D.; BROWN, B. N. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Australia: CSIRO. p.219. 2000.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2a• ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 4. ed, v. 2, p. 319-332, 2005.

KUMAR, V.; BHARTI, A.; NEGI, Y. K.; GUSAIN, O.; PANDEYI, P.; BISHT, G. S. Screening of Actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, pp. 205-214, 2012.

IBA – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/web/pt/dados-fatos/>>. Acesso em: 03/03/2014.

LACAZ, C. S. ; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C. ; HEINS-VACCARI, E. M. ; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: A guide to identification**. 2a Edição. Copyright American Society for Microbiology, Washington, 1993.

LOQMAN, S.; BARKA, E. A.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Volume 25, Issue 1, pp 81-91, 2009.

MELO, F. M. P. **Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (*Zea Mays* L.) com atividade antifúngica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo – Instituto Butantan. São Paulo, 2009.

MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria Angustifolia***. Tese.(Doutorado em Ciências: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, 2012.

MOORMAN, G. W. Botrytis Or Gray Mold. PENN STATE – College of Agricultural Sciences. Disponível em: <<http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/botrytis-or-gray-mold>> Acesso em: 22/01/2014.

NEWHOOK, F. J.; Microbiological control of Botrytis cinerea Pers.II. antagonism by fungi and actinomycetes. **Annals of Applied Biology**, 2008.

OLIVEIRA, S. R. **Atividade antagônica de actinomicetos contra *Botrytis cinerea*, patógeno da videira (*Vitis* sp.)**. Dissertação. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004. NEVES, M. C. P.; GAVA, C. çA. T. Actinomicetos no solo. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.

PAINE, T. ID.; STEINBAUER, M.J.; LAWSON, S. A. Native and exotic pests of Eucalyptus: ...9,f9,z,x9xx,0p'~ç'/., A worldwide perspective. **Annu. Rev. Entomol.** Vol 56. 181-201. 2011.

PERRYMAN, S, FITT B, HAROLD J. Fatores que afetam o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em linhaça (*Linum usitatissimum*) brotos, flores e cápsulas. **Biologia Applied Anual**. 140: 1-12. 2002.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. The ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência. Rural**, vol.43, n.10, pp. 1797-1803. 2013

PORSANI, M. V. **Variabilidade Espacial de Fungos da Região Entre-Marés da Ilha do Mel – Paraná**. Monografia de graduação em Ciências Biológicas – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PORSANI, M. V. A., **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil**. (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PORSANI, M. V. ; AMATUZZI, R. F. ; OLIVEIRA, B. H. ; BARATTO, L. C. ; DALITZ, C. A. ; BOZZA, A. ; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P. R. ; KOLM, H. E. PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical. Chemical and Biological Sciences**, v. 3, p. 899-913, 2013.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa MG. Editora UFV. Viçosa MG. Editora UFV. 2007.

SANFUENTES, E.A, ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & SILVEIRA, S.F. Comparison of baits to quantify inoculum density of *Rhizoctonia* spp. in *Eucalyptus* clonal garden soils. **Australasian Plant Pathology** 31:177-173. 2002.

SCHULTZ, B. **Levantamento de Doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos Estados do Paraná e Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Ciencia Florestal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, E. C.; SENA, K. X. DA F. R.; ANDRADE, M. S. A. S.; OLIVEIRA, T. J. G.; FILHO, A. A. S. Primeiras observações sobre o antagonismo *in vitro* do *Streptomyces* sp. IA-10493 dirigido a fungos fitopatogênicos. **Revista do Instituto de Antibióticos**.p. 121-125, Recife, 1984.

SILVA, M. D. D.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; ZAUZA, E. A. V. Etiologia do oídio do Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. n 26, p. 201-205.2001.

SILVA, J. C.M.; COELHO, L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinErea*, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus sp.* em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 27-36 27. 2003.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. **World congress on computers in agriculture**, American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOARES, A. C. F, SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S. Streptomyces antagonism against Cladosporium fulvum Cooke and Fusarium oxysporium f.sp. lycopersici. **Ciência Rural**. vol.39 no.6 Santa Maria Sept. 2009.

SUTTON, J. C.; LI, D-W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Gliocladium roseum: A versatile adversary of Botrytis cinerea in crops. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 316 - 328, 1997.
TOFOLI, J. F; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. Botrytis sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v73_1/tofoli.pdf> Acesso: 22/01/2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª Edição, Editora Artmed, 2012.

VALVERDE, S. R.; SOARES, N. S.; SILVA, M. L. da; JACOVINE, L. A. G.; NEIVA, S. de A. O comportamento do mercado da madeira de Eucalito no Brasil. **Biomassa & Energia**, Viçosa, v. 1, n. 4, p. 393-403, out./dez. 2004.

YOHALEM, D.S. Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 9 - 15, 2004.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 32 p, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS TESTES DE INIBIÇÃO COM 7 DIAS . TODOS OS VALORES DE F SÃO SIGNIFICATIVOS A 1% DE PROBABILIDADE.

Arquivo scottknotvivi7dias.txt Data 11/11/2014 Hora 14:19:52

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	1.24808	0.24962	9.7325 **
Resíduo	12	0.30777	0.02565	
Total	17	1.55585		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
5	12	5.0643	9.7325	0.0006

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	0.60573 a
2	0.30547 b
3	0.37087 b
4	0.75067 a
5	0.22993 b
6	0.97310 a

MG = 0.53929

CV% = 29.70

Ponto médio = 0.48655

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95524	0.51302	Sim

DADOS

.7672	.6435	.4065
0.0000	.4393	.4771
.2553	.3522	.5051
.7520	.6675	.8325
.0792	.4065	.2041
.9731	.9731	.9731

APÊNDICE 2 - RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS TESTES DE INIBIÇÃO COM 14 DIAS. TODOS OS VALORES DE F SÃO SIGNIFICATIVOS A 1% DE PROBABILIDADE.

Arquivo scotknotvivi14dias.txt Data 11/11/2014 Hora 14:16:09

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	1.39134	0.27827	7.1441 **
Resíduo	12	0.46741	0.03895	
Total	17	1.85875		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
5	12	5.0643	7.1441	0.0025

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	0.62887	b
2	0.34483	b
3	0.36633	b
4	0.97310	a
5	0.34507	b
6	0.97310	a

MG = 0.60522

CV% = 32.61

Ponto médio = 0.48655

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.89651	0.04997	Não

DADOS

.7959	.6675	.4232
0.0000	.4843	.5502
.1761	.3979	.5250
.9731	.9731	.9731
.0607	.6128	.3617
.9731	.9731	.9731